

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Jakub Tolasz

RŮZNÉ METODY PŘÍPRAVY KAPILÁRNÍCH KOLON
PLNĚNÝCH SEPHADEXEM PRO GELOVOU
CHROMATOGRAPHII

Various methods of preparation of capillary columns
packed with Sephadex for gel chromatography

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Praha 2013

Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Pavla Coufala, Ph.D., a že jsem všechny použité informační zdroje a literaturu řádně citoval. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....
podpis

Poděkování

Úvodem této diplomové práce bych chtěl poděkovat svému školiteli panu Prof. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. za výborné vedení při mé experimentální práci, jeho ochotu a optimismus při řešení problémů a cenné rady, které mi během konzultací poskytl. Díky patří také mým rodičům, kteří mé studium umožnili, a v jehož průběhu mě podporovali.

Abstrakt

V této diplomové práci byly připraveny kapilární kolony s vnitřním průměrem 530 μm plněné částicemi gelu. Tyto kolony jsou určeny pro gelovou chromatografii. K jejich přípravě byly použity tři různé metody plnění. Plnění mokrých částic v suspenzi s organickým rozpouštědlem, následným vysušením a nabotnění částic vodou do formy gelu. Plnění mokrých částic přímo v suspenzi s vodnou fází. A nasátí suchých částic gelu vzduchem a následným botněním vodou do formy gelu. Připravené kolony byly porovnávány pomocí analýz kyseliny hyaluronové a thiomocoviny. Pomocí fenylalaninu byly stanoveny základní parametry kolony určené pro gelovou chromatografii. Tlakové charakteristiky v závislosti na průtokové rychlosti mobilní fáze byly využity pro srovnání kvality náplně kolon připravených různými metodami.

Předmětová hesla:

Analytická chemie, separační metody, kapilární gelová chromatografie

Klíčová slova:

Sephadex G-10, Sephadex G-15, Sephadex G-25, kapilární náplňová kolona

Abstract

In this diploma thesis, capillary columns with an inner diameter of 530 microns filled with gel particles were prepared. These columns are intended for gel chromatography. Three various methods of filling were used for their preparation. The first method was based on filling of wet particles in suspension with the organic solvent, followed by drying and swelling of particles with water into the form of gel. The second method used filling of wet particles in the suspension form with the aqueous phase. The last method started with suction of dry gel particles by air and continued with their subsequent swelling with water into the form of the gel. The prepared columns have been compared analysing hyaluronic acid and thiourea. The basic parameters specified for the gel column chromatography were determined by using phenylalanine. The pressure characteristics depending on the flow rate of mobile phase were used to compare the quality of packing of the columns prepared by various methods.

Subject words:

Analytical chemistry, separation methods, capillary gel chromatography

Keywords:

Sephadex G-10, Sephadex G-15, Sephadex G-25, packed capillary column

Obsah

1	ÚVOD	10
1.1	CHROMATOGRFIE	10
1.2	MIKROKAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE	11
1.3	VYLUČOVACÍ CHROMATOGRFIE	12
1.3.1	VÝVOJ STACIONÁRNÍCH FÁZÍ	13
1.3.2	GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRFIE	14
1.3.3	PRAKTICKÉ VYUŽITÍ GPC	16
1.4	SEPHADEX	19
1.4.1	HISTORIE	19
1.4.2	VLASTNOSTI SEPHADEXU V KOLONĚ	21
1.5	TESTOVÁNÍ KOLON	22
1.6	CÍL PRÁCE	24
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
2.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	25
2.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	25
2.3	POUŽITÉ MATERIÁLY	26
2.4	PŘÍPRAVA KAPILÁRNÍCH KOLON	27
2.5	PLNĚNÍ KAPILÁRNÍCH KOLON	27
2.5.1	PLNĚNÍ ORGANICKOU FÁZÍ	27
2.5.2	PLNĚNÍ VODNOU FÁZÍ	30
2.5.3	REVERZNÍ PLNĚNÍ PODTLAKEM	31
2.6	TESTOVÁNÍ KOLON	33

3	VÝSLEDKY A DISKUSE	35
3.1	VÝBĚR VHODNÝCH ANALYTŮ	35
3.2	OPAKOVATELNOST MĚŘENÍ	38
3.3	PARAMETRY KOLONY	40
3.4	KOLONY PLNĚNÉ ORGANICKOU FÁZÍ	42
3.5	KOLONY PLNĚNÉ VODNOU FÁZÍ	44
3.6	KOLONY PLNĚNÉ PODTLAKEM	46
3.7	SOUHRNNÉ SROVNÁNÍ TLAKŮ	47
4	ZÁVĚR	49
	PŘEHLED LITERATURY	50

Použité symboly a zkratky

ACN	Acetonitril
bar	Bar, jednotka tlaku
BSA	Hovězí sérový albumin z ang. Bovine serum albumin
Da	Dalton, jednotka molární hmotnosti
F	Průtoková rychlost
GC	Plynová chromatografie z ang. Gas chromatography
GPC	Gelová permeační chromatografie z ang. Gel permeation chromatography
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie z ang. High-performance liquid chromatography
HPGPC	Vysokoúčinná gelová permeační chromatografie z ang. High-performance gel permeation chromatography
K	Rozdělovací koeficient
LC	Kapalinová chromatografie z ang. Liquid chromatography
n	Počet měření
N	Počet teoretických pater
PEEK	Polyetheretherketon

PTFE	Polytetrafluorethylen
s	Směrodatná odchylka
SEC	Vylučovací chromatografie z ang. Size exclusion chromatography
SF-LC	Kapalinová chromatografie s dělením toku z ang. Segmented-flow liquid chromatography
s_r	Relativní směrodatná odchylka
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě z ang. Thin-Layer chromatography
t_R	Retenční čas
μl	Mikrolitr, jednotka objemu
$\mu\text{l}/\text{min}$	Mikrolitr za minutu, jednotka průtokové rychlosti
μm	Mikrometr, jednotka délky
V_0	Mrtvý objem
V_{Gel}	Objem částic gelu
V_p	Objem pórů v částicích gelu
V_{total}	Celkový teoretický objem kolony
V_R	Retenční objem
$w, w_{1/2}$	Šířka píku při základně a v polovině výšky

1 Úvod

1.1 Chromatografie

Chromatografie je jedna ze separačních technik, která slouží k dělení komplexních vzorků na jednotlivé komponenty a ke stanovení množství ve vzorku. Nejdůležitějšími chromatografickými metodami jsou plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Podle odhadů je dnes téměř 60% všech analýz na světě prováděno právě pomocí chromatografie.

Princip chromatografie je založen na rozdělení látek vzorku mezi dvě nemísitelné složky. Vzorek je rozpuštěný v mobilní fázi, kterou může být plyn, kapalina nebo superkritická tekutina, a pohybuje se společně s ní přes stacionární fázi, která může být pevná nebo kapalná látka zachycená v koloně. Vzhledem k vzájemným působením se stacionární a mobilní fáze, jsou jednotlivé látky vzorku za dostatečně dlouhou dobu odseparovány.

Základní veličinou pro popis chování látky v koloně během separace je rozdělovací koeficient, který je podílem aktuálních koncentrací téže látky ve stacionární fázi a mobilní fázi. Vyjadřuje se pomocí vztahu

$$K = \frac{c_s}{c_M}, \quad (1)$$

kde K je rozdělovací koeficient, c_s je koncentrace látky ve stacionární fázi a c_M je koncentrace téže látky v mobilní fázi.

Objev chromatografie se datuje k roku 1906 kdy Mikhail Tswett využil první kapalinovou adsorpční kolonovou chromatografii k separaci rostlinných barviv. Ve

skleněných kolonách s vnitřním průměrem 1 – 5 cm a délkou 50 – 500 cm, použil jako adsorbent uhlíčitán vápenatý a oddělil chlorofyl od ostatních karotenoidů. Tato separace trvala velmi dlouho [1].

Klasická teorie chromatografie, může být chápána tak, že se v koloně během separace ustavuje nekonečné množství rovnováh v diskrétně oddělených částech kolony. Tyto diskrétně oddělené části jsou označovány jako teoretická patra a jejich šíře jako výškový ekvivalent teoretického patra. Za tento výklad chromatografických principů byla v roce 1952 udělena Nobelova cena za chemii pánům Martin a Synge [2].

1.2 Mikrokapalinová chromatografie

Několik desítek let po první zmínce o chromatografii Tswettem byla provedena první (GC). Vývoj plynové a kapalinové chromatografie (LC) nebyl oddělen, nově využívané prvky v jednom byly s úspěchem aplikovány i ve druhém odvětví. Pro GC byly zapotřebí kolony mnohem menších průměrů. A následně byly tyto úzké kolony využity i v LC. Duté kapiláry s aktivními místy pouze na povrchu kolony používané v GC byly pro LC nedostatečné. Proto se začaly kapilární kolony plnit stacionárními fázemi [3] a tento pokrok byl použit s úspěchem i v původní GC [4].

Kolony pro kapalinovou chromatografii mohou být z nejrůznějších materiálů. Základní podmínkou je, aby vnitřní povrch kolony byl hladký, protože hrubý povrch by zhoršoval separační účinnost. Kolony se tedy vyrábějí z oceli, z tvrzeného skla nebo z polyetheretherketonu (PEEK) a dalších různorodých materiálů. Typické rozměry kolony jsou 1 – 30 cm na délku s vnitřním průměrem 2,1 – 7,6 mm. Mikrokolony jsou delší a užší o vnitřním průměru do 1 mm.

První aplikace kapilární chromatografie sloužily k analýze stopových množství kovových iontů na konci padesátých let [5]. Jejich plný potenciál mohl být využit až s nástupem (HPLC) [6, 7] na začátku sedmdesátých let. První separace na mikrokolonách s dobrými výsledky byly publikovány v roce 1978, kdy své práce publikovali Guiochon [8] a Knox s Gilbertem [9].

Metody HPLC přinesly jednu hlavní výhodu. Vysoký tlak, který bylo možno na kolonu aplikovat, výrazně snížil čas analýzy oproti kolonové chromatografii. Další zkrácení doby analýzy přineslo právě použití mikrokolon, tato výhoda je však ve srovnání s dalšími zanedbatelná. Snížilo se především množství chemikálií potřebných k provedení experimentů. Možnost analýzy malého objemu vzorku, který je pro analýzu k dispozici, může být například při klinických aplikacích zcela zásadním faktorem. Zóny analytů se v koloně s nižším průměrem méně rozmývají, kvalita separace tedy prudce roste.

Nižší nároky na množství mobilní fáze jsou výhodné nejen finančně. Za kolonu mohou být zařazeny citlivější detektory, které vyžadují malé množství vzorku pro kontinuální analýzu. Jedná se především o detektory hmotnostně spektrometrické, plamenový spektrofotometr a fluorescenční spektrofotometr. Tyto detektory mají velmi vysokou citlivost, a proto mohou být po separaci detekována i velmi malá množství analytů. Toto snížení potřeb chemikálií se projevilo i v technických požadavcích na ostatní části chromatografů, jako jsou dávkovače a pumpy. Byly vyvinuty moderní přístroje, které jsou dnes již komerčně dostupné. Přesto kapilární kapalinová chromatografie i dnes zůstává metodou používanou více na akademické půdě než v průmyslových závodech. A je dále vyvíjena a miniaturizována do podob chromatografických čipů ve spojení především s hmotnostním spektrometrem.

1.3 Vylučovací chromatografie

Typ stacionární fáze je vybírám podle použité separační metody. Důležitými vlastnostmi stacionárních fází jsou tvar, velikost, porozita a rozpětí velikosti částic. Stacionární fáze mohou být neporézní, celistvé s aktivním porézním povrchem, porézní, perfuzní (částice s makropóry) nebo monolitické. Většinou jsou částice kulovitěho tvaru, protože takové částice se do kolony naplní rovnoměrněji než částice nepravidelné a kolona naplněná jednotně má větší separační účinnost. Monolitické náplně jsou v posledních letech populární, protože i při použití vyšších průtokových rychlostí dosahují nízkých provozních tlaků. Rozsah velikosti částic by měl být co nejužší,

protože malé částice snižují propustnost kolony a velké částice zvětšují výškový ekvivalent teoretického patra.

Použití polymerních materiálů v HPLC je stále oblíbenější a to hlavně díky dobré stabilitě v celém rozsahu pH. Ve srovnání s používanějším silikagelem mají nižší separační účinnost a některé polymerní materiály jsou nevhodné pro vysoké tlaky nebo jsou nabobtnávány rozpouštědlem. To znamená, že změna mobilní fáze je velmi obtížná, ne-li nemožná. Proto nemohou být polymerní materiály využívány ve spojení s gradientovou elucí. Dnes nejpoužívanější polymerní fází je kopolymer styren-divinylbenzen a methakrylát.

1.3.1 Vývoj stacionárních fází

Separace pomocí plynu nebo organických rozpouštědel byla určena pro látky s malým počtem atomů. Pro dělení velkých látek sloužila pryskyřice. Syntetická pryskyřice s bohatou trojrozměrnou porézní strukturou pórů, jejichž velikost byla závislá na podmínkách syntézy, nebyla připravována příliš reprodukovatelně. Proto byly proteiny děleny nejprve pomocí adsorpčních vlastností a až objevení pravidelné struktury krystalů zeolitů [10] vedlo k definování separační techniky s dělením podle velikosti molekul, tedy vylučovací chromatografie (SEC) [11].

Objevení SEC bylo převratnou novinkou a mnoho vědců přišlo s velkým množstvím různých aplikačních využití. Michael J. Telepchak publikoval v jednom článku hned čtyři aplikace pro kolonu plněnou skleněnými korálky s navázaným iontoměničem, frakcionaci krevní plasmy, analýzu drog v krevní plasmě bez nutnosti předúpravy vzorku, analýzu alkoholů v nápojích a analýzu metabolických produktů drog [12]. Touto komplexní publikací dokázal, že metoda SEC je velmi všestranná se širokou škálou možných využití.

Nejpoužívanější stacionární fází byly částice silikagelu s definovanou velikostí. Silikagel byl připravován různými metodami a vzniklo mnoho podob modifikovaných částic silikagelu. Byl použit také gel z polyvinylacetátu [13].

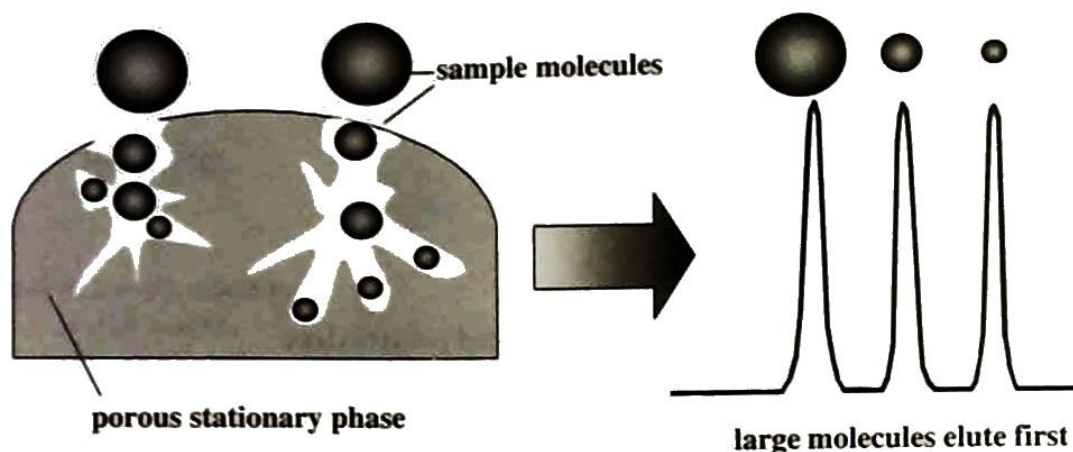
Použití částic dextranového gelu pro separaci podle velikosti byla představena Porathem a Flodinem v časopise Nature. Metoda byla pojmenována jako gelová filtrace, jak navrhl Tiselius [14]. Dále byla publikována studie podmínek pro separaci aminokyselin, peptidů a proteinů na tomto dextranovém gelu [15].

Haller se domníval, že částice, které je nutno před použitím nabobtnávat, jsou připravovány příliš náhodně a tento postup je nereprodukovatelný. Použil tedy ke svým separačním experimentům porézní sklo [16]. Tento odolný materiál měl velkou stabilitu a definovanou pórovitost. Analýzy probíhaly velmi rychle a ani vyšší tlak nebyl překážkou. Dalším z mnoha vyzkoušených stacionárních fází byl porézní oxid hlinitý [17], ten se ale později uchytil především v GC [18].

Dnes jsou nejvíce využívány komerčně vyráběné gely. Bio-Gel na bázi polyakrylamidu, MicroPak na bázi polystyrenu, agarózový gel na bázi sacharidového polymeru galaktózy a taky Sephadex. Všechny tyto gely, s výjimkou Sephadexu, jsou využívány více v elektroforéze než v gelové chromatografii. Agarózový gel se také využívá jako kultivační médium v mikrobiologii.

1.3.2 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie (GPC) je speciální druh vylučovací kapalinové chromatografie, založené na podobném principu separace molekulovým sítem, tedy podle různé velikosti molekul. Větší molekuly jsou z pórů gelu nebo polymeru eluovány dříve, zatímco malé molekuly jsou v těchto pórech zadržovány déle, jak je vidět na **obrázku 1**. Toto je hlavní rozdíl oproti ostatním metodám kapalinové chromatografie, gelová chromatografie tedy není založena na žádné fyzikálně – chemické interakci látky se stacionární fází náplňové kolony. Mobilní fáze může být vodná nebo organická rozpouštědla. Podle typu mobilní fáze rozlišujeme dvě základní techniky, gelová filtrace (vodná mobilní fáze) nebo gelová permeace (nepolární organická mobilní fáze) [19].



Obrázek 1 Schéma principu separace v pórech gelu a jeho projev v chromatogramu, převzato z [19].

Částice stacionární fáze mají póry různé velikosti. Při difúzi molekul do pórů stacionární fáze jsou pozorovány dva extrémy. Molekuly, které jsou příliš velké na to, aby pronikly do pórů, se nezadržují a jsou z kolony eluovány s mobilní fází jako první vylučovaná složka (tzv. totální eluce). Oproti tomu malé analyty mohou difundovat do všech pórů, a proto jsou zadržovány nejdéle (tzv. totální zadržení). Látky střední velikosti mohou pronikat pouze do některých pórů a z kolony eluují mezi největšími a nejmenšími. Toto rozpětí nazýváme frakcionačním rozmezím či elučním oknem a je dáno vlastnostmi konkrétního gelu [19].

Před příchodem detektorů schopných zpracovávat signál kontinuálně během analýzy, se GPC prováděla pomocí techniky s děleným tokem mobilní fáze (SF-LC) [20]. Tato metoda spočívala v tom, že eluent vytékající z kolony se jímá po stejně velkých frakcích do oddělených zkumavek. Získané frakční vzorky se dále analyzovaly metodami klasické analytické chemie. Grafickým výstupem tohoto měření byl sloupcový chromatogram.

V roce 1974 byla publikována první práce, která propojila pomalé metody GPC s HPLC a vznikla tak moderní rychlá analytická metoda. Doba analýzy se zkrátila z tehdejších několika hodin na několik minut a množství mobilní fáze se snížilo

z 300 ml potřebných k jedné analýze více jak třicetkrát. K tomuto urychlení analýzy mohlo dojít jenom díky novému počítačovému programu, který dokázal kontinuálně zaznamenávat signál z UV/VIS spektrofotometru [21].

Spojení těchto dvou technik se rychle rozšířilo a vznikla metoda s označením vysokoúčinná gelová permeační chromatografie (HPGPC) [22], což vedlo k dalšímu rozšíření využití SEC technik. Byla například připravena kolona plněná silikagelem při tlaku 700 bar o rozměrech 20 x 0,32 cm. Na této koloně byla s tetrabromethanem jako mobilní fází provedena separace aromatických uhlovodíků od benzenu po benzopyren během několika minut [23]. Pro purifikaci RNA nádorového viru byla použita ocelová kolona o délce 3 m a vnitřním průměrem 4,5 mm plněná skleněnými korálky. Celý proces purifikace trval pouhých 5 minut [24].

1.3.3 Praktické využití GPC

Pro popis retenčního chování je v gelové chromatografii používán retenční objem, který byl výhodnou veličinou právě v době používání SF-LC metody. Průtoková rychlost byla zajišťována pouze gravitační silou, nebyla tedy konstantní v celém průběhu analýzy. Retenční objem je výsledkem součinu retenčního času a průtokové rychlosti mobilní fáze, podle vzorce

$$V_R = F \cdot t_R , \quad (2)$$

kde V_R [μ l] je retenční objem, F [μ l/min] průtoková rychlost a t_R [min] retenční čas.

Pro kolonu naplněnou porézním gelem je používána veličina celkového objemu, který je vyjádřen vztahem

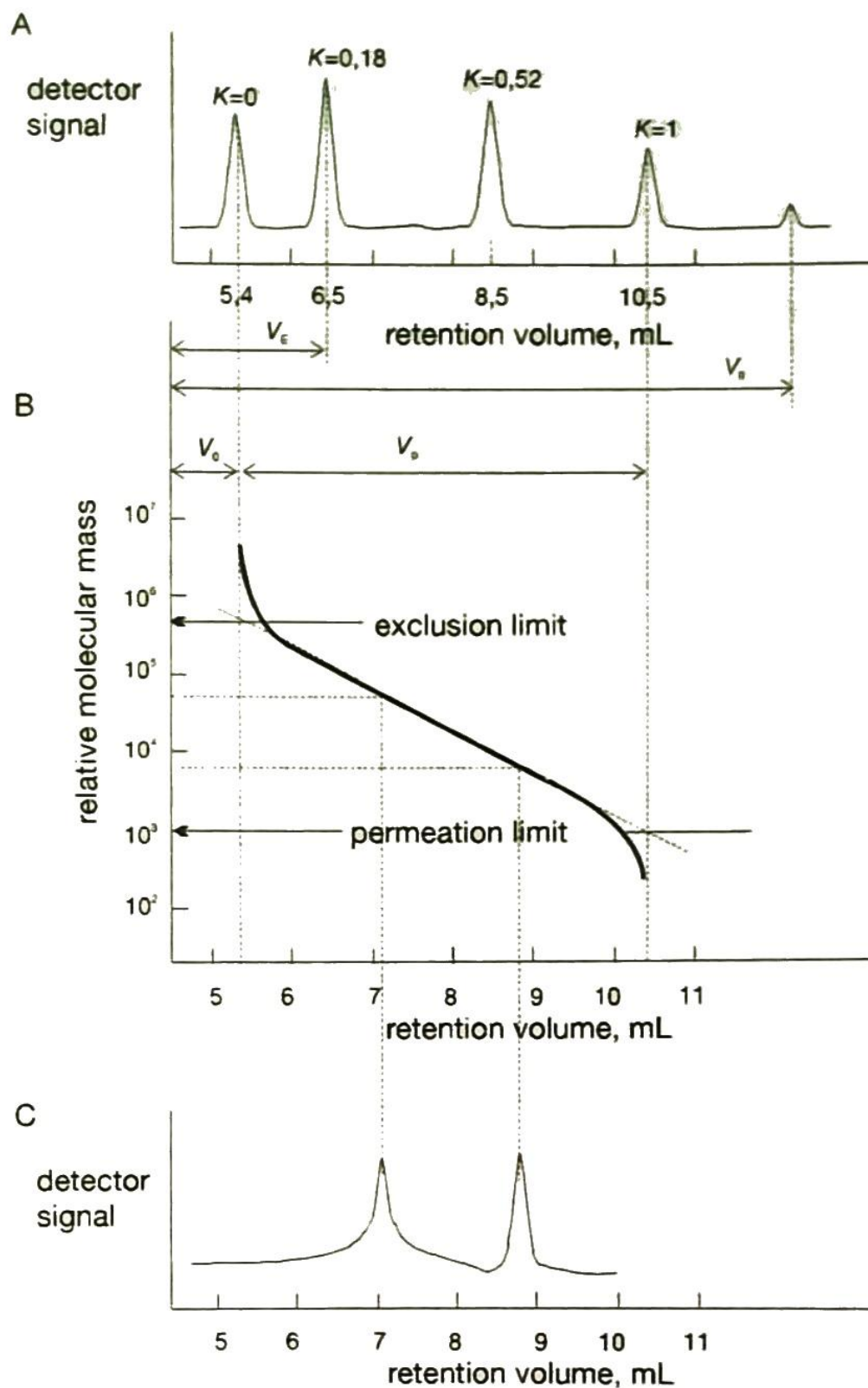
$$V_{total} = V_0 + V_p + V_{Gel} , \quad (3)$$

kde V_{total} [μl] je celkový objem kolony, V_0 [μl] mrtvý objem kolony, V_p [μl] objem pórů v částicích gelu a V_{Gel} [μl] objem gelu. Objem gelu je veličina, kterou nelze prakticky stanovit, proto se počítá teoreticky právě z rovnice (3), kdy celkový objem kolony je stanoven výpočtem podle jednoduchého vzorce pro objem válce nebo může být u kolon větších rozměrů přesněji stanovován experimentálně. V gelové chromatografii je mrtvý objem kolony roven retenčnímu objemu látky, která podléhá totální eluci. Maximální dosažitelný retenční objem $V_{R(max)}$ je dán celkovým součtem $V_0 + V_p$ a odpovídá retenčnímu objemu látky totálně zadržované. Retenční objem náhodné molekuly V_R [μl], která se v pórech stacionární fáze zadržuje, je dán součtem mrtvého objemu a objemu pórů, do kterých může tato látka difundovat. To je možné vyjádřit vztahem

$$V_R = V_0 + K \cdot V_p , \quad (4)$$

kde K je konstanta odpovídající rozdělovacímu koeficientu a nabývá hodnot od nuly do jedné. Přičemž $K=0$ přísluší molekule totálně eluované a $K=1$ molekule totálně zadržované [19].

Tyto znalosti lze využít k orientačnímu stanovení molární hmotnosti neznámé látky. Nejprve se provede analýza několika známých standardů a určí se jejich retenční objem, na **obrázku 2** (část A). Tyto standardy musí být vhodně zvoleny vzhledem k frakcionačnímu rozmezí dané kolony. Sestrojí se kalibrační křivka (část B) a z ní se odečte molární hmotnost neznámých látek (část C).

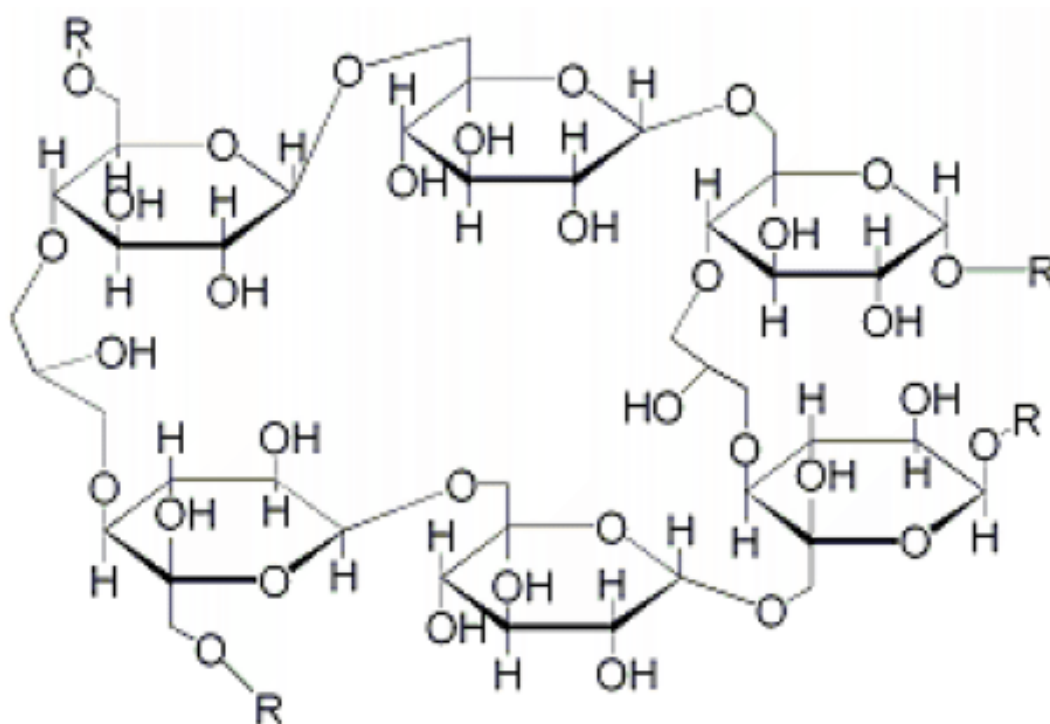


Obrázek 2 Grafické znázornění kalibrace a určení molární hmotnosti neznámých látek, převzato z [19].

1.4 Sephadex

1.4.1 Historie

Ve čtyřicátých letech pracoval Björn Ingelman s dextransy na universitě v Upsale. Jeho preparát z cukrové řepy byl nedopatřením infikován bakterií *Leuconostoc mesenteroides*. V tomto extraktu pak objevil dlouhý prokřížený α -1,6-glukosový polysacharid se zajímavými vlastnostmi, jeho struktura je zobrazena na **obrázku 3**. Ingelman si myslel, že tento prokřížený dextran bude moci nahradit pektin. Ale k jeho použití v analytické chemii ještě zbývalo ujít notnou část experimentální cesty [25].



Obrázek 3 Struktura dextranového řetězce, převzato z [26].

Nejprve byly kolony pro zónovou elektroforézu plněny škrobem [27], protože si však Porath a Flodin společně uvědomovali, že lepší naplnění kolony zúží zóny

analytů a zvětší separační účinnost, věnovali procesu plnění a typu škrobu velkou pozornost. Adsorpční efekt škrobu a jeho nedostatečná čistota vedla k hledání nových materiálů. Kvůli snížení adsorpce proteinů v elektroforéze byla používána celulóza. Ta je hlavní složkou papíru a tak pro použití v zónové elektroforéze byl vyroben papírový prach. I s touto stacionární fází byly adsorpce proteinů pozorovány. Poté co Flodin přešel z univerzitní laboratoře do komerční firmy Pharmacia, bylo jeho úkolem vyvíjet nové látky založené na dextranu pro klinické využití. Porath, který na univerzitě zůstal a stále s Flodinem komunikoval, si požádal o využití jednoho z dextranu pro elektroforézu. Pharmacia povolila jeho poskytnutí, ale bez jakýchkoliv dalších informací o přípravě gelu a s podmínkou, která zaručovala Pharmacii práva na jeho objevy. Porath později zjistil, že dextranový gel je opravdu vhodnou stacionární fází pro elektroforézu, protože adsorpce proteinů je ve srovnání s ostatními dříve používanými médii neporovnatelná, avšak stále pozorovatelná. Měl také stejný nedostatek jako škrob, a sice že malé a velké molekuly migrují jinými rychlostmi, ale z kolony eluují ve směsích [28]. Dnes je znám pojem frakcionační rozsah gelu, o kterém tehdy Porath nevěděl.

Využití gelu pro chromatografické metody byl pouze náhodný objev. Stalo se tak, když roztržitý italský profesor medicíny Noris Siliprandi zapomněl připojit elektrické napětí v jednom elektroforetickém experimentu. K jeho překvapení však i přesto v tomto horizontálním uspořádání došlo k separaci látek [25].

Další události nabraly rychlý spád, byly popsány optimální podmínky pro výrobu gelu s daným stupněm prokřížení a velikostí částic dextranu. Byly popsány operační parametry, jako je velikost kolony a průtoková rychlost mobilní fáze. Byly vypracovány postupy přípravy gelu a základní analytické metody využití. Všechna tato data byla patentována pro švédský a americký trh společně [29, 30, 31]. Každý, kdo si zakoupil tento gel, měl automaticky právo na provedení gelové filtrace dle těchto patentovaných postupů [28].

Dnes je Sephadex vyráběn ze syntetického hydrofilního dextranu. V gelové chromatografii je využíván jako jedna z hlavních složek stacionární fáze v kombinaci s ostatními pomocnými materiály. Ty mohou molekulárnímu sítu dodat další vlastnosti zvyšující účinnost a selektivitu separace [25].

Pro rozlišení různých druhů Sephadexů se používá dodatečné označení, například G-25. Toto označení má dvojí význam, G jako gel a číslo označuje množství vody potřebné ke správnému nabotnění právě do formy gelu. V tomto případě je potřeba 2,5 gramů vody na jeden gram suchého Sephadexu [28].

Dnes je gelová filtrace pomocí Sephadexu využívána hlavně k předúpravě vzorků různými metodami purifikace, k frakcionaci vzorku před další analýzou nebo zakoncentrování analytů za současné purifikace.

1.4.2 Vlastnosti Sephadexu v koloně

Dušan Berek se ve své práci [32] zabýval botnavostí Sephadexu, jeho stabilitou v koloně a změnami separační účinnosti po kontaktu částic gelu se vzduchem, tedy jejich částečným vysušením neboli odbotnáním v konkrétních podmínkách. Zjistilo se že:

- Vnesení malého množství vzduchu nebo kapaliny, která výrazně snižuje botnání částic gelu, do kolony vede ke znatelnému zvýšení separační účinnosti a snížení celkového objemu stacionární fáze především snížení mrtvého objemu kolony.
- Celkové vyschnutí celého sloupce stacionární fáze nemusí nutně vést ke zničení kolony, jak se předpokládalo a dosud se mylně uvádí v literatuře.
- Také nebyly pozorovány žádné změny v šířce frakcionačního rozsahu, tedy elučního okna.

Vysvětlení těchto pozorování říká, že odbotnané částice se pohnou a zapříčiní snížení objemu stacionární fáze, objem pórů se však nezmění, sníží se pouze mrtvý objem kolony, což samo o sobě vede k malému zvýšení separační účinnosti. Pokud se však odbotnané částice gelu nemohou dostatečně pohnout, protože odbotnání je buď příliš malé nebo jejich adheze k jiným částicím či povrchu kolony je příliš velká, vytvoří se kanálek prostupující celou kolonou a separační účinnost se sníží či dokonce zcela ztratí.

Částice gelu mohou být také odboťované osmotickým vlivem relativně nízkou koncentrací velkých rozpuštěných molekul nanesených na kolonu. To může vysvětlovat malé kolísavé změny separační účinnosti během separace [32].

1.5 Testování kolon

Jedním z důležitých faktorů ukazujících kvalitu kolony je její stabilita. Ta může být kontrolována opakovaným měřením stále stejného vzorku. Parametr ukazující neměnnost, respektive opakovatelnost, je směrodatná odchylka s , která se počítá podle následujícího vztahu

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad (5)$$

kde n je počet měření, \bar{x} je aritmetický průměr všech měření a x_i je hodnota jednoho měření. Je-li směrodatná odchylka velká, znamená to, že opakovaná měření jsou výrazně odlišná. Výhodnější je relativní směrodatná odchylka s_r , která se vyjádří vztahem

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}}. \quad (6)$$

Takto lze totiž porovnávat i opakovatelnost měření různých látek mezi sebou.

Účinnost kolony charakterizuje, jak moc se zóny separovaných látek v koloně rozmývají. Mírou separační účinnosti chromatografické kolony je počet teoretických

pater, který lze spočítat z charakteristik píků odečtených z chromatogramu. Například retenční čas a šířka píku při základně, respektive v polovině jeho výšky, jak ukazuje vztah

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2, \quad (7)$$

kde N je počet teoretických pater v koloně, w je šířka píku při základně a $w_{1/2}$ je šířka píku v polovině jeho výšky. Šířka i pološířka musí být ve stejných jednotkách jako veličina v čitateli zlomku. V GPC mohou být k výpočtu využity retenční objemy místo retenčních časů.

1.6 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je modifikovat a optimalizovat postup plnění kapilární kolony částicemi gelu, který byl popsán v bakalářské práci [33]. A vyvinout nové postupy přípravy stejné kolony. Tyto různé metody posléze porovnat pomocí analýzy několika látek a určit, který z těchto postupů přípravy kapilární kolony naplněné gelem je nejlepší.

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Jako stacionární fáze pro plnění kolon byly využity Sephadex G-10 o velikosti částic kategorie medium (40 – 120 μm) a o frakcionačním rozpětí 0 – 700 Da, Sephadex G-15 o velikosti částic kategorie fine (20 – 80 μm) a o frakcionačním rozpětí 0 – 1500 Da a Sephadex G-25 o velikosti částic kategorie fine (20 – 80 μm) a o frakcionačním rozpětí 1000 – 5000 Da, (vše Pharmacia Chemicals, Uppsala, Švédsko). Suspenze pro plnění organickou fází byla připravena pomocí acetonitrilu 99,9 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Pro přípravu vzorků na testování kolon byly použity β -alanin 99 % (Carlo Erba, Itálie), L- cystein 98 %, L-fenylalanin 98 %, L-histidin 98 % (vše Reanal, Budapešť, Maďarsko), L-glycin 99 %, L-valin 99 %, kreatinin 99 % (oba Merck, Darmstadt, Německo), L-arginin 98 %, L-tryptofan 98 %, thiomocovina 99 % (vše Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), sodná sůl kyseliny hyaluronové izolovaná ze *Streptococcus equi*, čistá, skladována při -20°C, BSA 99 % (oba Sigma-Aldrich, Česká republika). Na přípravu veškerých vzorků, suspenze pro plnění vodnou fází i jako mobilní fáze a médium k botnání gelu byla použita odplyněná deionizovaná voda. K vysušení kapiláry byl použit plynný dusík 5,0 (Linde, Praha, Česká republika).

2.2 Použité přístroje

Veškerá vážení byla prováděna na analytických vahách XE-100A (Denver Instruments, Denver, USA). Pro odvzdušnění deionizované vody byla použita ultrazvuková lázeň Elmasonic S 15 H (P-Lab, Praha, Česká republika). Pro plnění kolony bylo využito lineárního čerpadla mobilní fáze Model 100DM (Isco, Lincoln, USA) nebo vodní vývěvy. Testování kolon bylo prováděno na mikrokapalinovém chromatografu Agilent Technologies 1200 Series (Santa Clara, USA), který se skládal z vakuového degasseru, gradientového čerpadla mobilní fáze, automatického dávkovače

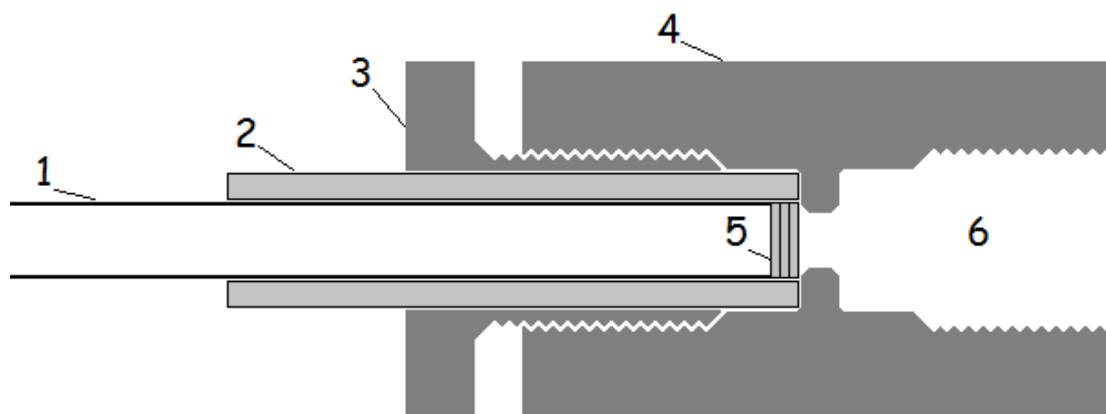
vzorku a detektoru s diodovým polem s detekční celou o objemu 500 nl a optické délce 10 mm, která byla v průběhu měření vyměněna za detekční celu o objemu 80 nl a optické délce 6 mm. Ovládání mikrokapalinového chromatografu, sběr a vyhodnocení dat bylo prováděno pomocí softwaru ChemStation verze B.04.01 od společnosti Agilent Technologies (Santa Clara, USA). Naměřená data byla exportována do Microsoft Office Excel 2007, kde byly zpracovány grafy.

2.3 Použité materiály

Pro přípravu kolony byla použita křemenná kapilára potažená polyimidem s vnitřním průměrem 530 μm a vnějším průměrem 650 μm (Supelco, Bellefonte, USA). Pro zajištění kapiláry ve šroubech byla využita peeková trubička s vnitřním průměrem 750 μm a vnějším průměrem 1/16'' (Watrex, San Francisco, USA). Pro přípravu frity byl použit disk skelné vaty o průměru 3 mm (Knauer Säulentechnik, Berlin, Německo). Těsnění do plnicího reservoáru bylo vyrobeno z 6 mm disku Red PTFE/White silicone septa (Supelco, Bellefonte, USA). Byly použity plastové šrouby s vnitřním průměrem 1/16'' s ferulemi a k nim kompatibilní plastové spojky a zátky (VICI, Schenkon, Švýcarsko).

2.4 Příprava kapilárních kolon

Pro všechny metody plnění byla kapilární kolona připravována totožně a její schematické znázornění je na **obrázku 4**. Byla uříznuta kapilára o délce 23 cm nebo 16 cm (1) a pomocí ní byla vyříznuta fritu (5) z disku skelné vaty, fritu měla vždy 3 vrstvy. Do šroubu (3) byla vložena peeková trubička (2), připravená kapilára s fritou byla vsunuta do peekové trubičky tak, aby jejich konce byly zarovnané. Fritu v koloně zajišťovala spojka (4). Tato spojka zajišťuje fritu a při jejím odstranění je nutná obezřetnost. Druhá strana spojky (6) měla při různých metodách plnění odlišnou funkci.



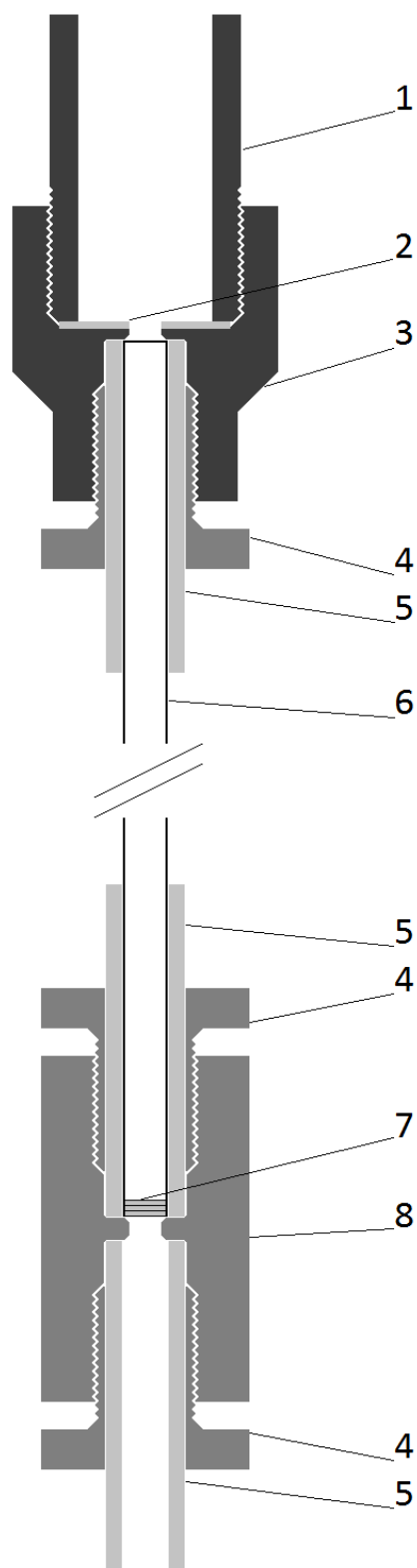
Obrázek 4 Schéma zakončení připravené kapilární kolony. 1 – kapilára, 2 – peeková trubička, 3 – plastový šroub, 4 – plastová spojka, 5 – fritu ze skelné vaty, 6 – volný konec plastové spojky.

2.5 Plnění kapilárních kolon

2.5.1 Plnění organickou fází

Schéma aparatury pro plnění kapilární kolony mokrou cestou je znázorněno na **obrázku 5**. Na volný konec připravené kapiláry (6) byl nasazen šroub (4) s peekovou

trubičkou (5). Na tento šroub byl pomocí redukce (3) připevněn suspenzní rezervoár (1). Při plnění kapiláry pomocí organické fáze nemusí být připojována žádná pumpa, úspěšnější je samovolné plnění gravitační silou. A to tak, že připravená suspenze organické fáze a částic gelu byla pipetou vnášena pomalu do suspenzního rezervoáru naplněného toutéž čistou organickou fází. Částice gelu tedy pomalu sedimentovaly a u zúženého zakončení rezervoáru se nehromadily. Suspenze je přidávána až do úplného naplnění kapiláry. Přesný postup přípravy suspenze není důležitý, ale velké množství částic přilne i na stěny suspenzního rezervoáru. Toto uspořádání ve svislé poloze je dostačující k naplnění částic gelu do kapiláry. Křemenná kapilára potažená polyimidem je průhledná, což je při jejím plnění velká výhoda. Do volného konce spojky (6) **obrázek 4**, je v tomto případě připojen šroub s peekovou trubičkou. Ta zajistí lepší odvod organické fáze od konce kapiláry se skelnou vatou.



Obrázek 5 Schéma aparatury pro plnění kolony pomocí suspenze. 1 – kovový suspenzní rezervoár, 2 – silikonové těsnění, 3 – kovová redukce, 4 – plastový šroub, 5 – peeková trubička, 6 – kapilára, 7 – fritra ze skelné vaty, 8 – plastová spojka.

Po naplnění celé kolony byla kapilára uvolněna ze šroubů i peekových trubiček. Organická fáze byla opatrně odstraněna savým buničínovým čtverečkem. Toto postupné vysychání je také dobře pozorovatelné pouhým okem. Aby botnání gelu nevadily ani zbytkové stopy organické fáze, byla kolona vysušena plynným dusíkem. Na kapiláru byly opět nasazeny šrouby a pomocí redukce byla kolona připevněna k výstupu tlakové láhve. Do kolony byl přiveden proud plynného dusíku o tlaku 2 bary po dobu 5 minut. Tento krok je možné obejít a kolonu ponechat samovolně vyschnout, k dokonalému vyschnutí je zapotřebí několik dní. Takto připravená kolona ještě není určena k chromatografickým aplikacím. Poslední fází přípravy je botnání gelu. To je provedeno až bezprostředně před použitím kolony. Botnání probíhá při nízké průtokové rychlosti mobilní fáze 0,5 µl/min po dobu alespoň 12 hodin. Průtoková rychlost může být po zvlhčení celé kolony mírně zvýšena. Do volného konce spojky (6) **obrázek 4** je připojena vstupní kapilára detektoru a kolona je promývána tak dlouho, dokud není základní linie chromatogramu bez výrazného šumu. Připravenost kolony se ověří opakovanou separací, je-li separační účinnost již dále neměnná, kolona je připravena.

Touto metodou byla připravena také kolona, kdy plnicí suspenzí byla čistá organická fáze ACN, ale mobilní fáze pro botnání gelu obsahovala 10 % ACN. Stejný obsah této organické složky měla také mobilní fáze použitá při testování této konkrétní kolony.

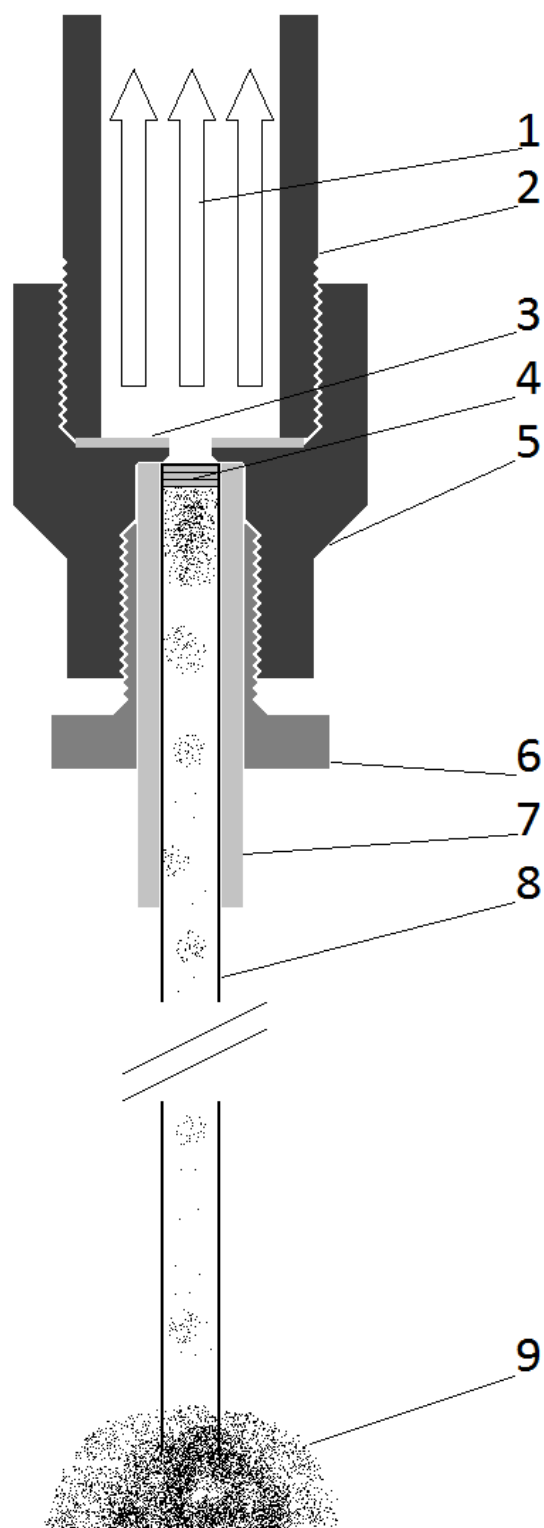
2.5.2 Plnění vodnou fází

Plnění suspenze s vodnou fází by mělo proběhnout co nejrychleji od přípravy této suspenze, dříve než částice gelu zcela nabotnají. Proto je s výhodou na suspenzní rezervoár připojeno lineární čerpadlo, které zajistí vysoký průtok mobilní fáze, asi 10 – 20 µl/min. Toto je jediná změna v uspořádání aparatury oproti plnění organickou fází. Pokud plnění neprobíhá správně je detekováno prudké zvýšení tlaku a průtok mobilní fáze musí být korigován. Po několika pokusech o naplnění kolony touto metodou se ukázalo, že je výhodnější vychýlit suspenzní rezervoár ze svislé polohy o 45°. A zároveň stejně jako při plnění organickou fází, rezervoár před přidáním suspenze naplnit do dvou třetin čistou vodnou fází použitou pro přípravu této suspenze. Při přímém plnění s vodnou fází naopak k žádnému vyschnutí dojít nesmí, protože by

došlo ke snížení separační účinnosti. Suspenzní rezervoár proto musí být co nejrychleji odstraněn a nahrazen přívodem mobilní fáze z pumpy přímo na kolonu. Gel ještě není zcela nabotnán a před první separací je kolona ještě několik hodin promývána nižší průtokovou rychlostí mobilní fáze. Do volného konce spojky (6) **obrázek 4** je připojena vstupní kapilára detektoru a kolona je promývána tak dlouho, dokud není základní linie chromatogramu bez výrazného šumu. I nyní je stabilita kolony kontrolována opakovanou separací.

2.5.3 Reverzní plnění podtlakem

Kapilára připravená v kapitole 2.4 Příprava kapilárních kolon již nemusí být dále upravována. Do volného konce spojky (6) **obrázek 4** je připojen vývod vodní vývěvy. Volným koncem kapiláry jsou nasáty suché částice gelu, jak je znázorněno na **obrázku 6**. S použitím vodní vývěvy je síla podtlaku špatně regulovatelná. Je-li tlakový gradient příliš velký, může dojít k poškození skelné vaty. Proto je nutno ji po naplnění kapiláry zkontrolovat, případně celou fritu renovovat. Tento postup je velice rychlý a jednoduchý. Poslední fáze botnání gelu je podobná jako po naplnění kolony organickou fází. Touto metodou se kapilára naplní daleko větším množstvím částic gelu, proces botnání proto musí probíhat daleko pomaleji. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,1 $\mu\text{l/min}$ a doba potřebná pouze pro zvlhčení celé kolony byla 24 hodin. Pro následujících 24 hodin byla průtoková rychlost zvýšená na 0,5 $\mu\text{l/min}$. Připravenost kolony je kontrolována kvalitou základní linie chromatogramu a opakovanou separací.



Obrázek 6 Schematické znázornění plnění kolony podtlakem. 1 – směr proudění vzduchu, 2 – suspenzní rezervoár připojený k vývěvě, 3 – silikonové těsnění, 4 – fritra ze skelné vaty, 5 – kovová redukce, 6 – plastový šroub, 7 – peeková trubička, 8 – kapilára, 9 – plněný prášek Sephadexu.

2.6 Testování kolon

Nejprve byly provedeny analýzy různých látek, především aminokyselin, z nichž byly vybrány dvě pro další měření. Testovat každou kolonu s velkým množstvím vzorků by bylo časově náročné a používat stále stejné látky je výhodné z hlediska porovnatelnosti kolon. Také musely být zvoleny látky určující totální eluci a totální zadržení v koloně. Všechny analýzy byly provedeny duplicitně při různých průtokových rychlostech.

S těmito vybranými látkami byla zkoumána stabilita kolony pomocí opakovaných měření. Tyto analýzy probíhaly v delším časovém období a kolona byla mezi jednotlivými sériemi měření odstavována z provozu. Kolonu bylo nutno zakonzervovat, aby gel nevyschnul. Nejprve byla prováděna konzervace holé kapilární kolony. Bylo sundáno veškeré šroubení a kapilární kolona byla oběma konci skrz septum umístěna do vialek s mobilní fází. Po delší době konzervace touto metodou však docházelo na jedné straně k vyplavování částic gelu z kolony a na druhé straně k uvolnění frity. Proto byl aplikován jiný postup pro přechovávání kolony. Na vstupní stranu kolony byla umístěna peeková trubička s plastovým šroubem a spojkou, stejně jako v kapitole 2.4 Příprava kapilárních kolon. Do volných konců plastových spojek (6) **obrázek 4** na obou stranách kapilární kolony byla umístěna plastová zátka. Takto zakonzervovaná kolona byla umístěna do lednice. Nejdelší časový interval, kdy byla kolona mimo provoz, nebyl delší než jeden týden. Po opětovném uvedení kolony do provozu, byla kolona promývána nízkým průtokem mobilní fáze po dobu alespoň 12 hodin. Takto měřená dlouhodobá stabilita kolony byla provedena pouze s jednou kolonou naplněnou organickou fází. Vzorky potřebné k tomuto experimentu musely být stále stejné. Byly připraveny koncentrované standardy, které byly umístěny v lednici a před každým měřením byly do vialek ředěny stejným způsobem.

Sledovaným parametrem byl také tlak mobilní fáze při daném průtoku a jeho stálost s časem. Tento parametr byl, jako jediný, přímým indikátorem propustnosti kolony. Stalo-li se, že se kolona nějakým způsobem ucpala, tlak okamžitě lineárně rostl. Takovou kolonu již nebylo možné dál používat a musela být připravena nová kolona. Pokud byla kolona již připravena a používána k měření, stávalo se to vzácně. Pravidelně

k tomuto jevu docházelo v průběhu botnění gelu, tedy ještě ve fázi přípravy kolony. Pokud byla kolona špatně zakonzervována a došlo k částečnému vyschnutí částic gelu, byl tlak v koloně naopak o poznání nižší než před konzervací. V koloně se vytvořil kanálek a tlak výrazně nerostl ani se zvyšující se průtokovou rychlostí. Taková kolona má zhroucenou strukturu stacionární fáze a dále je nepoužitelná.

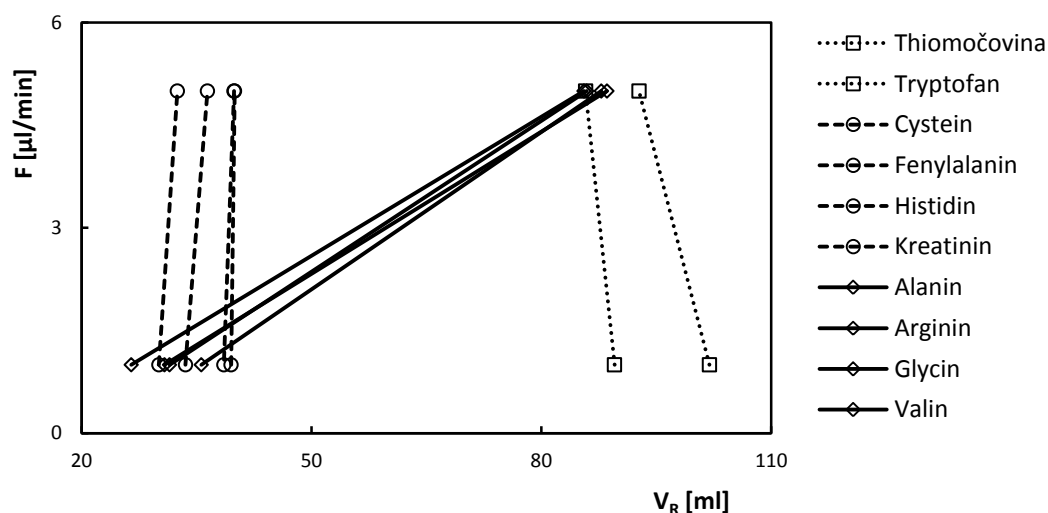
Pomocí tlaku byly také porovnávány kolony naplněné různými postupy stejným typem stacionární fáze a kolony naplněné stejnou metodou různými stacionárními fázemi. Nízký tlak mobilní fáze v gelové chromatografii je důležitým předpokladem pro lepší životnost kolony, separační účinnost a je ukazatelem správného nabotnění částic. Pro toto porovnání byla připravena kolona s příměsí ACN v mobilní fázi.

3 Výsledky a diskuse

Pro testování kolon bylo spočítáno, že kolona o délce 23 cm s vnitřním průměrem 530 μm má celkový vnitřní objem $V_{total} = 50 \mu\text{l}$. Jakákoliv látka, která bude eluovat s retenčním objemem větším než je celkový teoreticky spočítaný objem kolony, je v koloně zadržována i jinými fyzikálně – chemickými interakcemi.

3.1 Výběr vhodných analytů

Nejprve musely být vybrány vhodné analyty pro práci s náplňovou gelovou kolonou Sephadex. K dispozici bylo několik základních aminokyselin, thiomocovina a kreatinin. S těmito látkami byly provedeny dvě série měření při různé průtokové rychlosti mobilní fáze se vzorky o koncentraci 20 mmol.l^{-1} . Během měření byl sledován pouze retenční objem a jeho případná změna se změnou průtokové rychlosti. Každý vzorek byl při dané průtokové rychlosti analyzován třikrát a v **obrázku 7** jsou uvedeny průměrné hodnoty z těchto tří analýz.



Obrázek 7 Srovnání retenčních objemů látek při různých průtokových rychlostech $1 \mu\text{l/min}$ a $5 \mu\text{l/min}$.

Účelem těchto sérií měření bylo vyloučit nevhodné analyty pro kapilární gelovou kolonu Sephadex. Vytvořila se zvláštní skupina čtyř látek (alanin, arginin, glycin a valin), jejichž retenční objem se se změnou průtokové rychlosti výrazně změnil. I tvar jejich píků byl nesymetrický. S těmito látkami se již nepracovalo v žádném dalším experimentu.

Skupinu dvou látek, jejichž retenční objem vysoce přesahoval možný teoretický objem kapilární kolony, tvořily společně thiomocovina a tryptofan. Tyto látky jsou tedy v koloně bezesporu zadržovány i jinými interakčními mechanismy, než je princip molekulového síta. Thiomocovina byla zvolena jako látka, která byla vždy vylučovaná jako poslední a sloužila tak jako marker k ukončení analýzy.

Skupina látek cystein, fenylalanin, histidin a kreatinin byla pro další experimenty dostatečná, ale dvě z těchto látek nebyly příliš vhodné. Cystein vždy eluoval se dvěma píky těsně vedle sebe. Tato dvě maxima mohla být způsobena buď nečistotou vzorku, anebo zvláštní schopností cysteinu tvořit díky thiolové vazbě cystin. Pík kreatininu byl při dané koncentraci velmi široký a ve směsné analýze by zakryl všechny ostatní látky.

Látkou, kterou bylo nutno najít, byl také marker mrtvého objemu. Touto látkou může být jakákoliv větší molekula, dostupná, dobře detekovatelná UV/VIS spektrofotometrem a snadno rozpustná. Byla zvolena kyselina hyaluronová. Její možná použitelnost musela být ověřena, protože molární hmotnost monomerní jednotky této polymerní látky je 377 Da, což je méně než horní hranice frakcionačního rozmezí Sephadexu G-10. Nejlepší metodou je srovnání retenčního objemu s látkou ještě daleko větší, kde je jistota, že tato látka také bude značkovačem mrtvého objemu.

Tabulka 1 Srovnání retenčních objemů [μl] dvou markerů mrtvého objemu, při průtokové rychlosti 5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

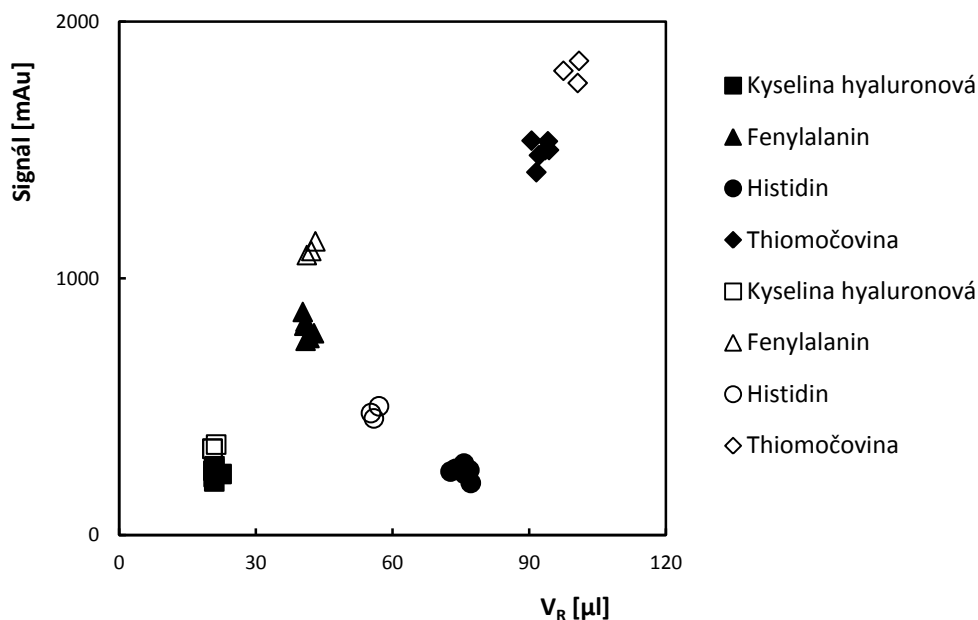
Kyselina Hyaluronová	BSA
20,74	22,62
20,69	22,34
20,88	22,87

Z hodnot v **tabulce 1** je patrné, že velká molekula jako je hovězí sérový albumin s molekulovou hmotností přibližně 66 500 Da má ještě o něco vyšší retenci. To může být způsobeno obtížnou prostupností v mikrokoloně, tedy že kanálky mezi částicemi gelu jsou zde velmi malé. Toto srovnání jednoznačně potvrzuje, že kyselina hyaluronová je vhodným značkovačem mrtvého objemu.

K dalším experimentům tedy byla vybrána kyselina hyaluronová, jako marker mrtvého objemu a histidin a fenylalanin jako látky částečně zadržované. Thiomočovina byla zvolena jako marker konce elučního okna. Látka, která by byla totálně zadržována, prakticky neexistuje. To je zřejmé z hodnoty dolní hranice frakcionačního rozmezí. Objem pórů v koloně tedy nemůže být stanoven experimentálně, ale pouze teoretickým výpočtem aproximace kalibrační závislosti na nulovou molární hmotnost.

3.2 Opakovatelnost měření

K měření stability gelové stacionární fáze byla využita kolona plněná organickou fází Sephadex G-10. Tyto analýzy probíhaly vždy na stejné koloně za stejných podmínek. Kolona byla před měřením vždy promývána konstantní průtokovou rychlostí a to po dobu 12 hodin při průtoku 1 $\mu\text{l/min}$ respektive 4 hodiny při průtoku 5 $\mu\text{l/min}$. Každý vzorek byl při nižší průtokové rychlosti měřen třikrát. Série s vyšší průtokovou rychlostí byla měřena vždy duplicitně. Pro porovnání je tedy k dispozici šest analýz.



Obrázek 8 Měření opakovatelnosti analýz. Plné značky odpovídají sérii měřené při průtokové rychlosti 5 $\mu\text{l/min}$, prázdné značky odpovídají sérii měřené při průtokové rychlosti 1 $\mu\text{l/min}$.

Hodnoty retenčních objemů byly statisticky zpracovány pomocí rovnic (5) a (6) z kapitoly 1.5 Testování kolon a výsledky jsou uvedeny v **tabulce 2**. Z porovnání hodnot v této tabulce lze vyvodit několik závěrů. Histidin je v koloně také zadržován

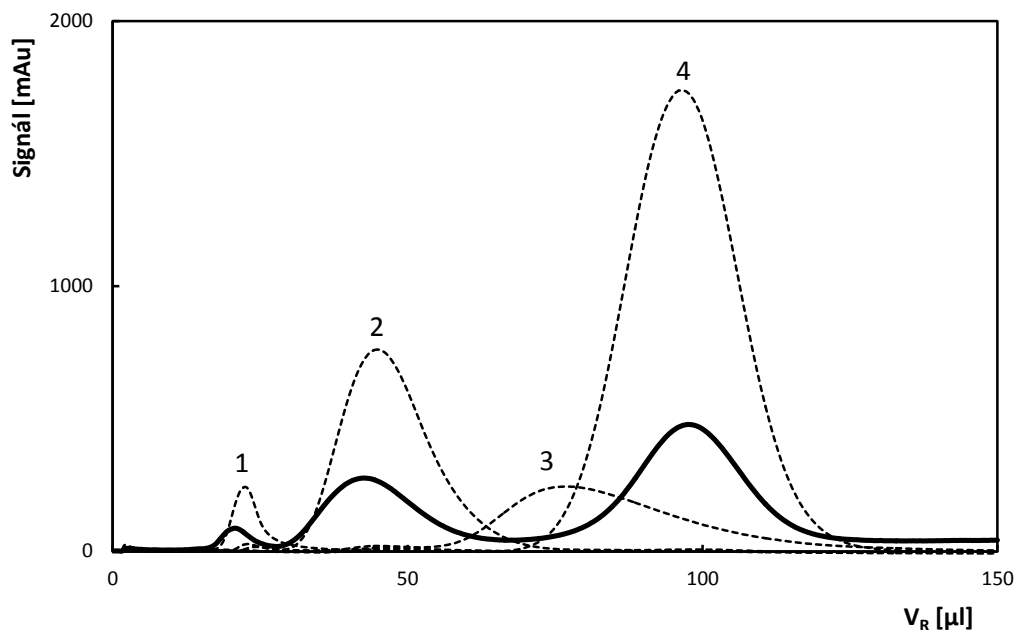
i jinými interakcemi podobně jako thiomočovina, protože jeho retenční objem je větší než teoretický celkový objem kolony. Tyto dodatečné interakce se výrazněji uplatňují při vyšší průtokové rychlosti.

Další skutečností je fakt, že všechny čtyři látky jsou od sebe na x-ové ose dostatečně vzdáleny a ve směsném vzorku by tedy neměl být problém s jejich oddělením. Proto byla na této koloně provedena také analýza směsi. Chromatogram této analýzy je znázorněn na **obrázku 9** společně s chromatogramy jednotlivých vzorků.

Tabulka 2 *Statistické zpracování výsledků měření opakovatelnosti. Hodnoty jsou uvedeny v obecném tvaru $\bar{x} \pm s(s_R)[\mu\text{l}]$.*

	1 $\mu\text{l/min}$	5 $\mu\text{l/min}$
Kyselina hyaluronová	20,75 \pm 0,21 (1,02 %)	21,09 \pm 0,47 (2,23 %)
Fenylalanin	42,13 \pm 0,89 (2,12 %)	41,20 \pm 0,81 (1,97 %)
Histidin	56,05 \pm 0,78 (1,40 %)	75,32 \pm 3,02 (4,01 %)
Thiomočovina	99,67 \pm 3,61 (3,62 %)	92,67 \pm 2,34 (2,53 %)

Analýza směsi je na **obrázku 9** znázorněna plnou čarou. Jednotlivé analyty eluují v pořadí kyselina hyaluronová, fenylalanin, histidin a thiomočovina. Ve směsném vzorku není patrný pík histidinu a to ani po zvýšení jeho koncentrace v tomto vzorku. Po zvýšení koncentrace se ale zvětšila výška druhého píku. Lze tedy tvrdit, že ve směsi se histidin drží rychlejší zóny s fenylalaninem a není stacionární fází v jeho přítomnosti tolik zadržován. Všechna měření z **obrázku 9** byla prováděna při průtokové rychlosti 5 $\mu\text{l/min}$. Pozorovaný tlak během analýz se pohyboval v rozmezí 16,4 – 17,8 bar.



Obrázek 9 Chromatogram směsi společně s jednotlivými analyty. 1 – kyselina hyaluronová, 2 – fenylalanin, 3 – histidin, 4 – thiomocovina.

3.3 Parametry kolony

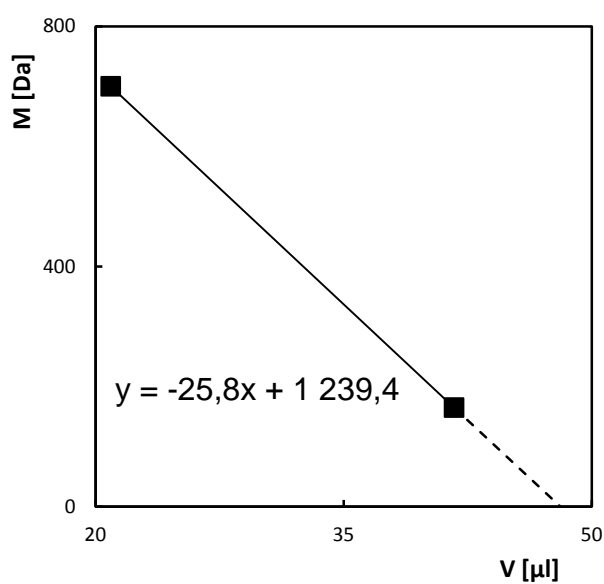
Hodnoty retenčních objemů kyseliny hyaluronové a fenylalaninu byly využity pro výpočet objemu pórů v koloně podle rovnice (3) z kapitoly 1.3.3 Praktické využití GPC. Tyto hodnoty jsou uvedeny v **tabulce 3**.

Objem maximálního zadržení byl aproximován z lineární závislosti mezi dvěma body, kdy mrtvému objemu byla přiřazena molární hmotnost horní meze frakcionačního rozmezí, tedy 700 Da. Molární hmotnost fenylalaninu je 165 Da. Tato závislost je znázorněna na **obrázku 10**.

Tabulka 3 Hodnoty dílčích objemů [μl] v koloně o délce 23 cm se stacionární fází Sephadex G-10. V_{total} – celkový teoretický objem kolony, V_0 – mrtvý objem kolony, $V_{\text{R(Phe)}}$ – retenční objem fenylalaninu, $V_{\text{R(max)}}$ – retenční objem látky totálně zadržované, V_p – objem pórů v částicích gelu.

V_{total}	V_0	$V_{\text{R(Phe)}}$	$V_{\text{R(max)}}$	V_p
50,7	21,0	41,7	48,1	27,1

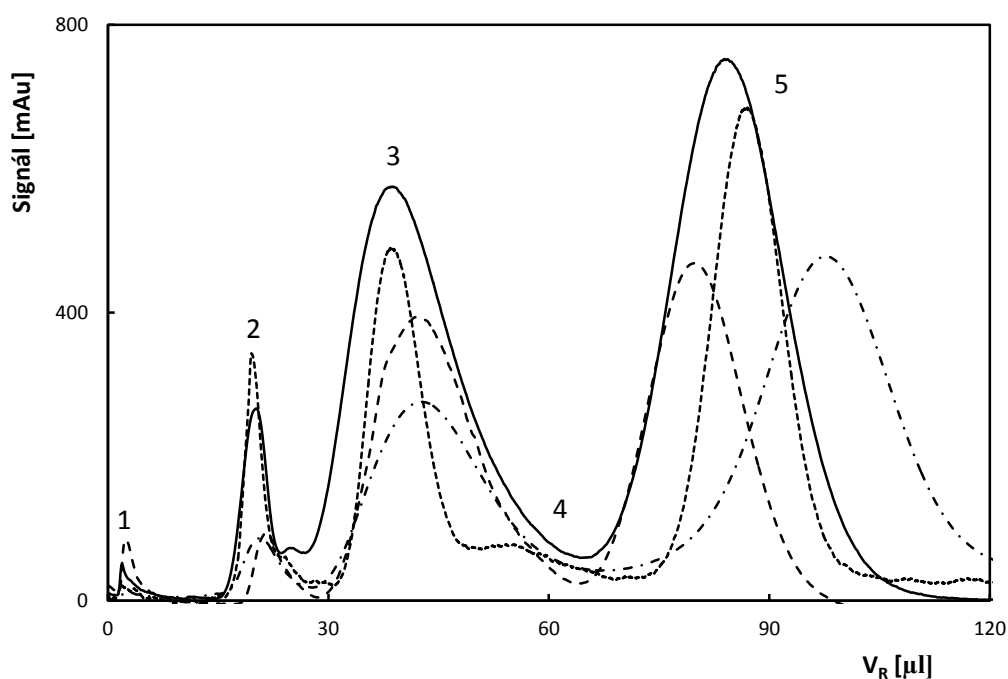
Z rovnice 4 v kapitole 1.3.3 Praktické využití GPC byl stanoven rozdělovací koeficient fenylalaninu pro tuto kolonu $K = 0,76$.



Obrázek 10 Kalibrační závislost molární hmotnosti na retenčním objemu s aproximací na nulovou hodnotu.

3.4 Kolony plněné organickou fází

Jedna kolona plněná organickou fází byla využita při experimentu s opakovatelností měření a ke stanovení základních parametrů gelové kolony. Toto měření prokázalo stabilitu stacionární fáze v dané koloně. To však neznamená, že kolony připravené stejnou metodou budou mít stejné separační vlastnosti. Z tohoto důvodu byly tedy připraveny další čtyři kolony. Analýza směsného vzorku kyseliny hyaluronové, fenylalaninu, histidinu a thiomocoviny na těchto kolonách je znázorněna na **obrázku 11**. V tomto případě byly všechny analýzy prováděny při průtokové rychlosti 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ a tlak během těchto analýz byl na všech kolonách shodně v rozmezí 6,9 – 8,1 bar.



Obrázek 11 Chromatogramy směsných vzorků na čtyřech různých kolonách Sephadex G-10. 1 – systémové píky, 2 – skupina píků kyseliny hyaluronové, 3 – skupina píků fenylalaninu, 4 – oblast, kde eluuje histidin, 5 – skupina píků thiomocoviny.

Z těchto měření lze jednoznačně říci, že každá připravená kolona je unikátní a samovolné plnění organickou fází není příliš reprodukovatelné. V případě, že by tyto kolony byly využívány k orientačnímu stanovení molární hmotnosti, musela by být provedena kalibrace u každé kolony samostatně. Největší rozdíly byly pozorovány u píku thiomočoviny, která v koloně podléhá jistým fyzikálně – chemickým interakcím.

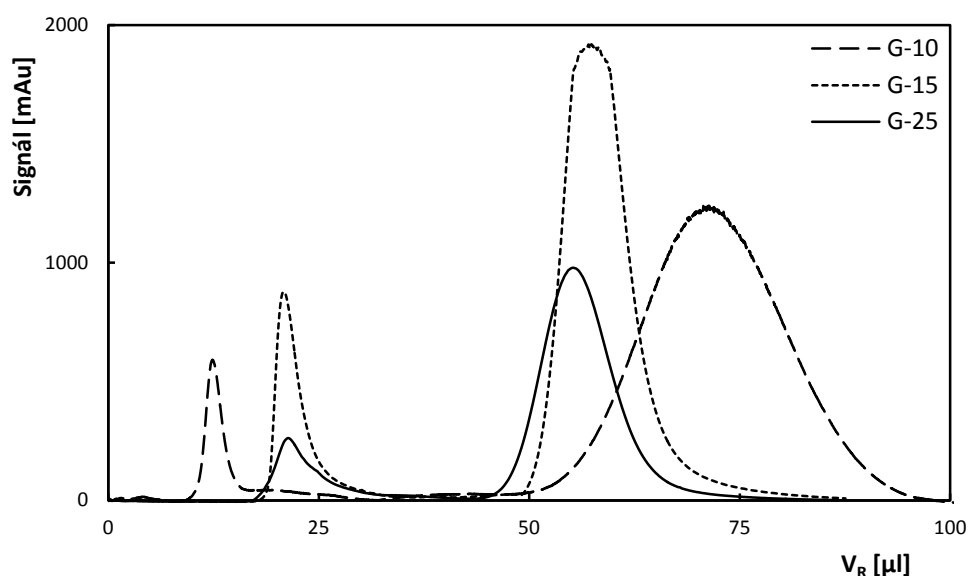
Další kolony, jejichž stacionární fází by byl Sephadex G-15 nebo G-25, nebylo možné touto metodou připravit. Sephadex s velikostí částic kategorie fine, tedy s částicemi menšími než je tomu u kategorie medium se do kapilární kolony plní velmi snadno. Množství částic takto naplněných je však příliš velké a v kapiláře není prostor k jejich botnání. Více prokřížený dextran totiž ke svému nabotnání potřebuje více vody. U Sephadexu G-15 je to asi 1,5 ml na gram suchého gelu a u Sephadexu G-25 dokonce 2,5 ml na gram suchého gelu. Zatímco u málo prokříženého dextranu jakým je Sephadex G-10, je to pouze 1,0 ml na gram suchého gelu. Všechny pokusy o přípravu těchto kolon skončily stejně. Tlak při botnání lineárně rostl i s velmi malou průtokovou rychlostí.

Touto metodou byla naplněna také kolona se Sephadexem G-10 s délkou 23 cm, kdy plnicí suspenzí byl čistý ACN. K botnání gelu a následně i jako mobilní fáze byl použit 10 % roztok ACN. Z hlediska stability analytů biochemické povahy sice není tato metoda výhodná, ale ukázalo se, že právě malá příměs organické složky v mobilní fázi dokáže významně snížit tlak v koloně. Porovnání tlaků při různých průtokových rychlostech na kolonách Sephadex G-10, které byly připraveny různými metodami, je uvedeno na **obrázku 14** v kapitole 3.7 Souhrnné srovnání tlaků.

3.5 Kolony plněné vodnou fází

Plnění kolon touto metodou bylo obtížné a některé kolony nebyly naplněny do celého objemu. Proto byly všechny kapiláry zkráceny na délku 16 cm. Celkový teoretický objem kapiláry o této délce je 35 μl .

Touto metodou mohly být naplněny kolony různých stacionárních fází. Na těchto kolonách byly provedeny analýzy směsi kyseliny hyaluronové a thiomocoviny za stejných podmínek. Průtoková rychlost byla ve všech měřeních 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. Chromatogramy testovaných látek na takto připravených kolonách jsou uvedeny na **obrázku 12**.



Obrázek 12 *Chromatogramy směsi dvou látek na kolonách s různou stacionární fází.*

Nejvýraznějším parametrem pro srovnání jednotlivých kolon je tlak mobilní fáze při daném průtoku. Srovnání v **tabulce 4** jednoznačně ukazuje, že tlak mobilní fáze roste se stupněm prokřížení dextransu. Tento trend je s ohledem na množství vody potřebné k nabotnutí gelu očekávaný.

Tabulka 4 *Orientační srovnání tlaku mobilní fáze v různých kolonách délky 16 cm při průtoku 1 $\mu\text{l}/\text{min}$*

Stacionární fáze	p [bar]
Sephadex G-10	5
Sephadex G-15	13
Sephadex G-25	19

Separace na kolonách G-15 a G-25 jsou velmi podobné. Oproti koloně G-10 se nepatrně snížil mrtvý objem kolony, protože se zvýšil objem gelu. Částice gelu G-15 a G-25 kategorie fine jsou menší a do kolony se jich vejde více. Celkový objem pórů v nich je menší, i když jednotlivé póry jsou větší. To se pozitivně projevilo tak, že látky v těchto kolonách jsou méně rozmyté a látky eluují z kolony mnohem dříve. Ačkoliv kyselina hyaluronová eluuje později, mrtvý objem kolony se ve skutečnosti snížil, protože kyselina hyaluronová už pro fáze Sephadex G-15 a Sephadex G-25 není značkovačem mrtvého času, jak je vidět z porovnání retenčních objemů s BSA v **tabulce 5**.

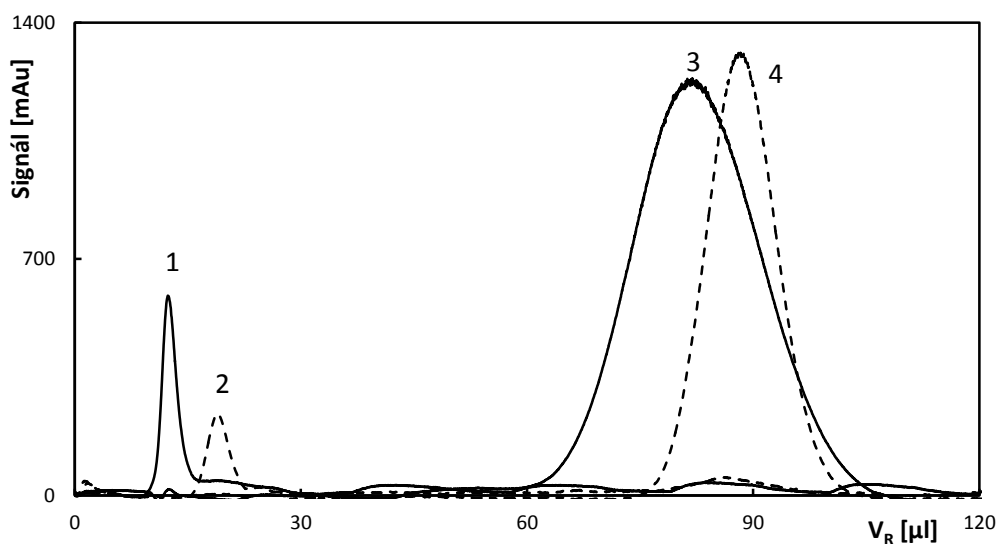
Tabulka 5 *Srovnání retenčních objemů [μl] kyseliny hyaluronové a BSA při průtokové rychlosti 1 $\mu\text{l}/\text{min}$.*

Stacionární fáze	Kyselina Hyaluronová	BSA
Sephadex G-10	12,10	13,08
Sephadex G-15	21,06	10,34
Sephadex G-25	21,44	10,98

V kolonách s kratší kapilárou došlo také ke snížení rozsahu elučního okna. Aby tyto kolony mohly být efektivně využívány, musely by se zvětšit jejich rozměry, především jejich délka. To by samozřejmě znamenalo další zvyšování tlaku. Plnění takových dlouhých kapilár je ale obtížné. Výhodnější by mohla být kapilára s větším vnitřním průměrem, jejíž naplnění by mohlo být snazší.

3.6 Kolony plněné podtlakem

Fáze botnání gelu je obdobná jako u metody plnění organickou fází a na ucpání kapiláry ještě náchylnější, a proto nemělo smysl pokoušet se o naplnění kolony Sephadexem G-15 nebo G-25 touto metodou. Pro srovnání byla připravena kolona Sephadex G-10 délky 23 cm. Byly analyzovány vzorky kyseliny hyaluronové a thiomocoviny za stejných podmínek jako s kolonou plněnou organickou fází. Srovnání chromatogramů je na **obrázku 13**.



Obrázek 13 Chromatogramy analýz kyseliny hyaluronové (1, 2) a thiomocoviny (3, 4) při průtokové rychlosti 1 $\mu l/min$. Píky 1 a 3 byly naměřeny na koloně plněné reverzně podtlakem. Píky 2 a 4 byly naměřeny na koloně plněné organickou fází.

Kolona naplněná pomocí podtlaku obsahuje více částic gelu a ty ve stísněném prostoru méně nabotnají. Kolona má tedy menší mrtvý objem a objem pórů v částicích gelu v důsledku zvýšení objemu gelu. Analýza je sice méně časově náročná, ale píky jsou více rozmyté, separační účinnost je tedy nižší. Tlak mobilní fáze v koloně plněné podtlakem se při průtoku 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ pohyboval okolo 5 bar.

3.7 Souhrnné srovnání tlaků

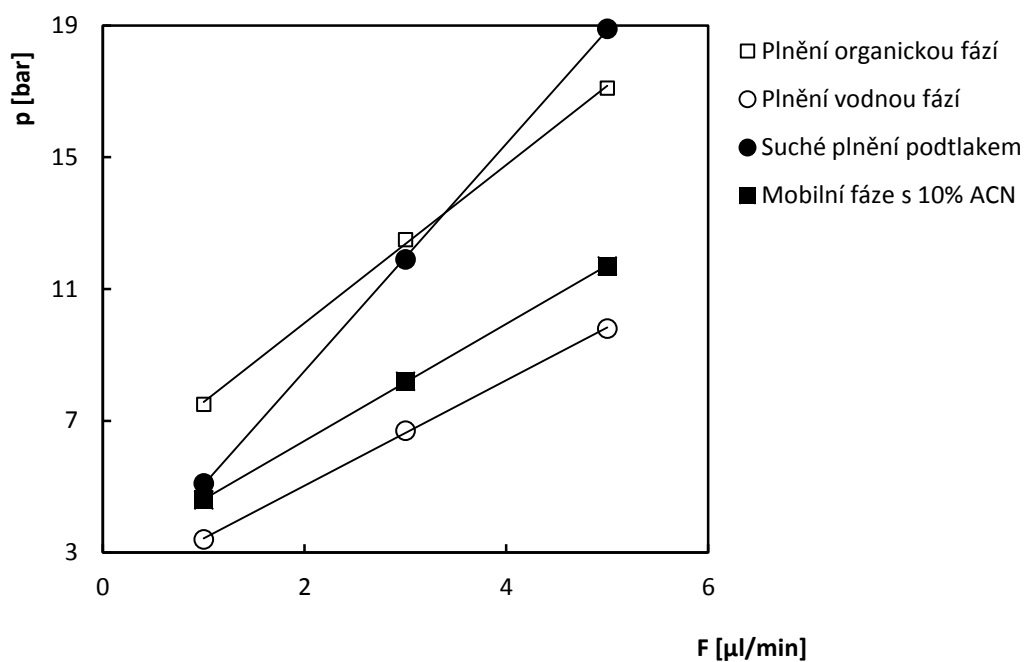
Na **obrázku 14** jsou přehledně zobrazeny hodnoty tlaků během analýz při různých průtokových rychlostech v kolonách Sephadex G-10 připravených různými metodami. Pro toto měření byla kolona plněná vodnou fází připravena z kapiláry o délce 23 cm, aby mohly být hodnoty porovnatelné. Vyšší tlak v koloně je zapříčiněn větším množstvím částic gelu naplněných do kolony. Takové částice nejsou zcela nabotnány a objem pórů v koloně se sníží. V této koloně se zkrátí eluční okno mezi totální elucí a totálním zadržením. Pro praktické využití by tato kolona musela být připravena z delší kapiláry.

V koloně připravené plněním suchých částic pomocí podtlaku roste tlak s průtokovou rychlostí strměji. Nižší hodnoty tlaku při nižší průtokové rychlosti jsou zřejmě způsobeny pomalejším a tedy kvalitnějším průběhem botnání gelových částic. Je tedy pravděpodobné, že kdyby probíhalo botnání částic po naplnění kolony organickou fází také pomaleji, byl by tlak v této koloně nižší. Tato skutečnost však nebyla žádným experimentem ověřena.

Nejnižší tlaky jsou v koloně plněné suspenzí s vodnou fází. Během tohoto plnění částice botnají nejprve ve volném prostoru suspenzního rezervoáru, kde zvětší svůj objem. Následně se jich do kolony k sobě naskládá méně a v koloně je tedy nižší objem gelu, ale vyšší objem pórů. Propustnost kolony je velmi dobrá. Během plnění však dochází k častému ucpání suspenzního rezervoáru nabotnanými částicemi.

Zvláštní kategorií je kolona, která byla naplněna organickou fází, ale k botnání částic gelu a jako mobilní fáze byl využit 10 % roztok ACN. Ve srovnání s kolonou plněnou stejným způsobem je tlak mobilní fáze mnohem nižší. To je dobré mít

na paměti, byla-li by kolona používána pro stanovení molární hmotnosti látek, kterým by přítomnost organické složky nevadila. V biochemických aplikacích, kde se Sephadex nejčastěji používá, by mohla být poškozena nativní struktura analyzovaných látek a stanovení by nebylo přesné.



Obrázek 14 Znáznornění závislosti tlaků mobilní fáze na průtokové rychlosti v kolonách Sephadex G-10 plněných různými metodami.

4 Závěr

V této diplomové práci byly vyvinuty tři metody plnění částic gelu do kapilární kolony pro gelovou chromatografii. Každá z těchto metod má své výhody i nevýhody a nelze jednoznačně určit, která z nich je nejlepší. Kolona naplněná přímou metodou s použitím vodné fáze má nejnižší provozní tlaky, její příprava je ale technicky nejnáročnější. Velmi jednoduchá, ale časově náročná je příprava kolony suchou metodou plnění podtlakem, ale tlak během analýz roste s průtokovou rychlostí strměji než u kolon připravovaných jinými metodami. Z hlediska provozních tlaků a náročnosti přípravy kolony, vychází metoda plnění pomocí organické fáze jako průměrná. Pro všechny postupy přípravy kolony by bylo zřejmě výhodnější použití kapiláry s větším vnitřním průměrem. Stejně tak by došlo ke zvýšení separační účinnosti a rozšíření elučního okna, kdyby kapilára byla delší.

Pro jednoduchou chromatografickou aplikaci jsou tyto kolony v dnešní době nedostatečné, mají nízkou separační účinnost a analýza je pomalá a časově náročná. Takto jsou však popsány podmínky pro použití první kolony ve dvou a více dimenzionálních chromatografických technikách, kde eluent z první kolony je po frakcích dávkován do druhé kolony. Na druhé koloně proběhne rychlá analýza a v jejím mezičase se sbírá nová frakce z první kolony. V tomto případě funguje kapilární kolona naplněná Sephadexem jako předseparační krok pro rozdělení vzorku na jednotlivé frakce.

Přehled literatury

- [1] Tswett, M. S.: On a new category of adsorption phenomena and on its application to biochemical analysis. *Proceedings of the Warsaw Society of Naturalists, Biology Section* **14(6)**, 20-39 (1905).
- [2] Martin, A. J. P.; Synge, R. L. M.: A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochemical Journal* **35**, 1358-68 (1941).
- [3] Weihrauch, H.: Chromatography with circular filter paper. *Chemiker-Zeitung* **80**, 415-18 (1956).
- [4] Purnell, J. H.: Comparison of efficiency and separating power of packed and capillary gas chromatographic columns. *Nature* **184**, 2009 (1959).
- [5] Okac, A.; Cerny, P.: Application of capillary chromatography in separation and determination of some metals. *Chemické listy pro Vědu a Průmysl* **48**, 14-15 (1952).
- [6] Perry, S. G.: High-performance liquid chromatography. *Chemistry in Britain* **7(9)**, 366-70 (1971).
- [7] Synder, L. R.: High-performance liquid chromatography. *Gas chromatography, Proceeding of the International Symposium on Gas chromatography (Europe)* **8**, 81-111 (1971).
- [8] Guiochon, G.: Preparation and operation of liquid chromatographic columns of very high efficiency. *Journal of Chromatography* **185**, 3-26 (1979).
- [9] Knox, J. H.; Gilbert, M. T.: Kinetic optimization of straight open-tubular liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **186**, 405-418 (1979).
- [10] Barrer, R. M.; Brook, D. W.: Sorption and reactivity of simple organic molecules on chabazite. *Transaction of the Faraday Society* **49**, 940-8 (1953).

- [11] Flodin, P.: Methodological aspects of gel filtration with special reference to desalting operations. *Journal of Chromatography* **5**, 103-15 (1961).
- [12] Telepchak, M. J.: New uses for molecular-size exclusion chromatography. *Journal of Chromatography* **86**, 125-34 (1973).
- [13] Heitz, W.; Klatyk, K.: New materials for column chromatography. *Journal of Chromatography* **9(9)** 521-5 (1971).
- [14] Porath, J.; Flodin, P.: Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature* **183** 1657-9 (1959).
- [15] Porath, J.: Gel filtration of proteins, peptides, and amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta* **39**, 193-207 (1960).
- [16] Haller, W.: Correlation between chromatographic and diffusional behavior of substances in beds of pore-controlled glass. Contribution to the mechanism of steric chromatography. *Journal of Chromatography* **32**, 676-84 (1968).
- [17] Baba, N.; Hara, T.: Use of porous alumina as a column packing for gel permeation chromatography. *Shimadzu Hyoron* **26(3)**, 279-84 (1969).
- [18] Alishoev, V. R.; Berezkin, V. G.: Gas adsorption chromatography using open glass capillary columns with aluminium oxide. *Zavodskay Laboratoriya* **60(12)**, 6-7 (1994).
- [19] Kellner, R.; Mermet, J. M.; Otto, M.: *Analytical chemistry*, **21.3.2**, 579-84 (2004).
- [20] Dolan, J. W.; Snyder, L. R.: Coated-open-tubular chromatography with flow-segmentation. *Journal of Chromatography* **185**, 57-72 (1979).
- [21] MacLean, W. W.: Polymer molecular weight distribution analysis at very high speed using on-line data handling. *Journal of Chromatography* **99**, 425-33 (1974).
- [22] Kirkland, J. J.: Porous silica microspheres for high-performance size exclusion chromatography. *Journal of Chromatography* **125**, 231-50 (1976).

- [23] Kirkland, J. J.: Microparticles with bonded hydrocarbon phases for high-performance reverse-phase liquid chromatography. *Chromatographia* **8**, 661-8 (1975).
- [24] Darling, T.; Albert, J.: Rapid purification of an RNA tumor virus and proteins by high-performance steric exclusion chromatography on porous glass bead columns. *Journal of Chromatography* **131**, 383-90 (1977).
- [25] Grund, E.; Janson J. Ch.: 50 Years of Sephadex Media. *BioProcess International*, **7**, 9, 26-31 (2009).
- [26] www.ecompound.com/Reaction%20reference/reaction_workup_and_separation.htm, 16. 1. 2013.
- [27] Porath, J. Flodin, P.: Zone electrophoresis in strach columns. *Biochimica et Biophysica Acta* **13(2)**, 175-82 (1954).
- [28] Flodin, P.: The Sephadex story, *Polymer Engineering and Science*, prostřednictvím web: <http://www.thefreelibrary.com/The+Sephadex+story.-a021187765> 15.4.2013
- [29] Flodin, P.: Gel-grain molecular filters. *Patent FR 1363978* (1964).
- [30] Flodin, P.; Johansson, J.; Johansson, H.: Calcium salt of dextran. *Patent US 3262847* (1966).
- [31] Porath, J.; Bennisch, H.: Method and apparatus for chromatographic separation. *Patent DE 1201093* (1965).
- [32] Berek, D.: Simple method for improving the efficiency of liquid chromatographic columns filled with soft gels. *Journal of Chromatography*, **151**, 222-4 (1978).
- [33] Tolasz, J.: Příprava a testování kapilární náplňové kolony sephadex G-10. *Praha: Univerzita Karlova v Praze*, (2010).